

REC'D 16 NOV 2004

WIPO

PCT



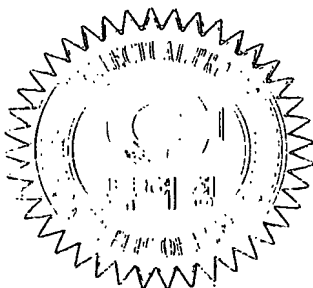
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0079363  
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 11월 11일  
Date of Application NOV 11, 2003

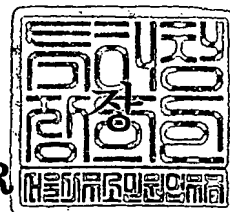
출원인 : (주)히스토스텝  
Applicant(s) HISTOSTEM CORPORATION



2004 년 10 월 21 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0002
【제출일자】	2003.11.11
【발명의 명칭】	냉동 보관된 제대혈로부터 중간엽 줄기세포의 분리 및 배양 방법
【발명의 영문명칭】	METHOD OF ISOLATING AND CULTURING MESENCHYMAL STEM CELL DERIVED FROM CRYOPRESERVED UMBILICAL CORD BLOOD
【출원인】	
【명칭】	( 주)히스토스텝
【출원인코드】	1-2000-052576-1
【대리인】	
【성명】	이병현
【대리인코드】	9-1999-000297-5
【포괄위임등록번호】	2003-058131-7
【발명자】	
【성명】	한훈
【출원인코드】	4-2000-052572-0
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김성환
【성명의 영문표기】	KIM, Sung-Whan
【주민등록번호】	710909-1110538
【우편번호】	135-120
【주소】	서울특별시 강남구 신사동 637-4 1층 102호
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이병현 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	12 면 29,000 원
【가산출원료】	0 면 0 원

【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	3	항	205,000	원
【합계】	234,000	원		
【감면사유】	중소기업			
【감면후 수수료】	117,000	원		
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 기타첨부서류[사업자등록증 사본]_1통 3. 중소기업기본법시행령 제2조에 의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류[소득세원천징수신고서 사본]_1통			

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 세포 치료제로서 가장 이상적인 냉동 보관되었던 제대혈을 이용하여 중간엽 줄기세포를 분리 및 배양하는 방법에 관한 것으로, 냉동 보관된 제대혈을 해동하여 aMEM(alpha-minimum essential medium) 배지로 희석하고 원심분리하여 단핵구를 수확하고; 얻어진 단핵구로부터 CD133 양성 세포를 분리하고; 그리고, 분리된 세포를 Stem Cell Factor, GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor), IL-3(interleukin-3) 및 IL-6(interleukin-6)이 포함된 aMEM 배지에 부유 배양하는 단계를 포함한다. 이 방법에 의하면, 세포수가 상대적으로 부족한 제대혈에서 중간엽 줄기세포를 효과적으로 분리 및 배양할 수 있으며, 이에 따르면 버려지고 있는 제대혈이 세포 치료제로서 각종 난치병을 치유하기 위한 중요한 수단으로 활용될 수 있다.

**【대표도】**

도 1f

**【색인어】**

제대혈, 중간엽 줄기세포, 면역거부반응

**【명세서】****【발명의 명칭】**

냉동 보관된 제대혈로부터 중간엽 줄기세포의 분리 및 배양 방법{METHOD OF ISOLATING AND CULTURING MESENCHYMAL STEM CELL DERIVED FROM CRYOPRESERVED UMBILICAL CORD BLOOD}

**【도면의 간단한 설명】**

도 1은 본 발명의 방법에 따른 냉동 보관된 제대혈 유래 중간엽 줄기세포주 배양 과정을 보여주는 사진으로, 도 1a, 1b, 1c, 1d, 1e 및 1f는 각각 5 일, 7 일, 10 일, 14 일, 20일 및 25 일 배양한 결과이다.

**【발명의 상세한 설명】****【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <2> 본 발명은 세포 치료제로서 가장 이상적인 제대혈을 이용하여 중간엽 줄기세포를 분리 및 배양하는 방법에 관한 것으로, 특히 영하 196 ℃로 냉동 보관되었던 제대혈로부터의 재현성 있는 분리 및 배양 방법에 관한 것이다.
- <3> 중간엽 줄기세포는 뼈, 연골, 지방, 신경, 근육 등으로 분화할 수 있는 원시 세포를 의미하는 것으로, 이들은 골수에 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 실제로 골수로부터 중간엽 줄기세포를 분리하여 연구하거나 여러 질병에 대한 임상시험으로 많이 이용되고 있는 실정이다.

- <4> 골수에서 중간엽 줄기세포를 얻는 것은 쉬운 일이지만, 골수의 획득이 용이하지 않고, 타인 간 줄기세포 이식시 면역 거부 반응 문제를 해결하는 것이 현실적으로 어려운 것으로 알려져 있다.
- <5> 한편, 제대(탯줄)혈은 골수에 비해 획득이 용이할 뿐 아니라, 많은 제대혈 유닛(units)을 확보할 경우 환자의 조직적합성 유전자와 일치 또는 가장 유사한 제대혈 줄기세포를 사용할 수 있으므로 면역거부 반응도 해결할 수 있다는 장점이 있다. 그러나, 골수에 비해 제대혈에서 중간엽 줄기세포를 얻는 일이 매우 어렵기 때문에 연구 및 임상적으로 적용하기가 어렵다는 문제가 있다.
- <6> 종래에는 산모로부터 출산한지 24 시간 내에 제대혈로부터 줄기세포를 분리 및 배양하는 방법이 주로 사용되었다. 그러나, 냉동 보관되었던 제대혈로부터 밀도구배 원심분리 방법에 의해 세포를 분리하는 방법으로는 세포를 분리하기가 어려울 뿐 아니라 세포를 잃어버리기도 쉽기 때문에 제대혈 내 얼마 안 되는 중간엽 줄기세포 배양은 더욱 어려운 일이 되고 있다.
- <7> 종래의 중간엽 줄기세포 분리 및 배양 방법으로는 미국특허 제5,197,985호 및 제 5,486,359호 등이 있는데, 여기에서는 사람의 골수로부터 중간엽 줄기세포를 분리 및 정제, 배양하는데 있어서 중간엽 줄기세포의 증식 방법을 개시하고 있다. 즉, 미국특허 제5,197,985호에서는 사람 골수-유래의 중간엽 줄기세포를 골 형성 세포로 분화시키는 방법으로서, 분화 없이 중간엽 세포 성장을 촉진하고 배양시 기질 표면으로 중간엽 줄기세포만의 선택적 흡착을 허용하는 인자를 포함하는 배지에 골수 시료를 첨가하는 것에 의해 골수 시료로부터 분리, 정제 및 배양 전개된 사람 골수-유래의 중간엽 줄기세포를 다공성 담체에 도입하고, 사람 간질 줄기세포를 골

세포로 분화시키는데 필요한 인자를 포함하는 환경으로 이식하는 단계를 포함하는 방법을 개시하고 있는데, 여기에서 다공성 담체는 수산화인회석(hydroxyapatite)와 인산3칼슘(tricalcium phosphate)를 포함하는 것이고, 배지는 우태혈청(FBS; fetal bovine serum)을 포함하는 BGJ<sub>b</sub> 배지이거나 F-12 영양소 혼합물을 포함하는 것을 사용하고 있다. 또한 미국특허 제5,486,359호에서는하나 이상의 조직 타입(예를 들어 뼈, 연골, 근육 또는 골수 기질)으로 분화할 수 있는 분리된 사람 중간엽 줄기세포, 사람 중간엽 줄기세포를 분리, 정제 및 배양 전개하는 방법, 그리고 이러한 세포의 특성과 용도, 특히 시약, 진단 및 치료적 용도에 대하여 개시하고 있다. 여기에서 중간엽 줄기세포는 골수에서 유래되고 배지는 우태혈청을 포함하는 BGJ<sub>b</sub> 배지에서 배양하는 것으로 되어 있다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <8> 본 발명은 위와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 영하 196 ℃로 냉동 보관된 제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 밀도구배 원심분리 동안 잃어버리는 일 없이 얻을 수 있는, 재현성 있는 중간엽 줄기세포 분리 및 배양 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

#### 【발명의 구성 및 작용】

- <9> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는,
- <10> 냉동 보관된 제대혈을 해동하여 αMEM(alpha-minimum essential medium) 배지로 희석하고 원심분리하여 단핵구를 수확하고;
- <11> 얻어진 단핵구로부터 CD133 양성 세포를 분리하고; 그리고,
- <12> 분리된 세포를 Stem Cell Factor, GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor), IL-3(interleukin-3) 및

IL-6(interleukin-6)이 포함된 aMEM 배지에 부유 배양하는 단계를 포함하는, 냉동 보관된 제대혈로부터 중간엽 줄기세포의 분리 및 배양 방법을 제공한다.

- <13> 본 발명은 영하 196 °C로 냉동 보관 중인 제대혈 유닛으로부터 중간엽 줄기세포를 분리 및 배양하는 재현성 있는 방법을 제공한다. 즉, 세포수가 상대적으로 부족한 제대혈로부터 중간엽 줄기세포를 분리 및 배양하는 최적 조건을 찾아냄으로써 제대혈을 이용한 난치병 치료에 기여하고자 하였다.
- <14> 이를 위하여 본 발명에서는, 냉동 보관된 제대혈로부터 단핵구를 회수하고, 얻어진 단핵구로부터 CD133 양성 세포를 분리한 후, 세포성장인자인 Stem Cell Factor, GM-CSF, G-CSF, IL-3 및 IL-6을 첨가한 aMEM 배지에서 배양하는 것에 의해, 원시 중간엽 줄기세포의 확보와 배양 성공율을 획기적으로 높일 수 있었다. 즉, 냉동 보관된 제대혈에서는 적혈구와 혼합되어 있어 순수 단핵구를 분리하기 어렵기 때문에, 줄기세포가 있다고 생각되는 CD133 양성 세포만을 선택하여 배양하여야 한다. 이와 같은 본 발명의 방법에 따르면 중간엽 줄기세포 배양 성공률은 90% 이상으로 나타나는데, 종래 냉동보관된 제대혈이나 골수로부터 줄기세포를 배양 및 증식시킨 예는 없었다.
- <15> 이하, 실시예를 통하여 본 발명에 따른 냉동 보관된 제대혈로부터 중간엽 줄기세포를 분리 및 배양하는 방법을 구체적으로 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명의 예시일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- <16> 실시예 1: 중간엽 줄기세포의 분리 및 배양
- <17> 영하 196 °C에서 냉동 보관 중이던 제대혈을 37 °C의 water bath에 넣어서 바로 해동하였다. 제대혈로부터 단핵구를 분리하기 위해, aMEM(alpha-minimum essential medium, Jeil



Biotech Services, Korea)으로 제대혈을 2 배 용량으로 희석한 후 실온에서 10 분간 300xg로 원심분리하였다. 분리된 buffy coat 층을 수확하여 다시 2 배 용량의 aMEM으로 희석한 후 Ficoll-Hypaque에 중첩하고 실온에서 30 분간 300xg로 원심분리를 시행하였다.

<18> 혈액으로부터 단핵구를 분리하는 데는 Ficoll(슈크로스의 중합체)과 Hypaque (디트리조 에이트 나트륨; sodium ditrizoate)의 중합체인 Ficoll-Hypaque가 주로 이용된다.

Ficoll-Hypaque의 비중은 1.007 g/ml로, 단핵구는 이보다 가벼우나 적혈구는 이보다 무겁기 때문에 비중차에 의한 분리가 가능하다. 즉, 혈액을 Ficoll-Hypaque 위에 올려서 원심분리하면 단핵구는 Ficoll-Hypaque 위에 모이게 된다.

<19> 이와 같은 밀도구배 원심분리 방법으로 얻어진 단핵구를 다시 첨가물이 섞이지 않은 세척용 aMEM으로 2 회 세척하였다.

<20> 얻어진 단핵구를 CD133 분리 키트(Isolation kit: Miltenyi Biotec, Germany)로 양성(positive) 선택적 분리하였다. 분리 방법은 먼저, 얻어진 단핵구에 100  $\mu$ l의 블로킹 시약(blocking reagent)을 첨가하여 비-특이적 결합을 제거하고, 이어서 100  $\mu$ l의 CD133/Microbead를 잘 섞어서 전체 용적을 500  $\mu$ l로 하여 4  $^{\circ}$ C에서 30 분간 배양하였다. 10 배 용량의 PBS(D-phosphate buffered saline, Jeil Biotech Services, Korea)를 첨가하여 원심분리(300xg, 10 분)한 후, 튜브에 붙어있는 세포를 제외하고 PBS를 버린 다음 500  $\mu$ l PBS로 재현탁(resuspension)하였다. 이어서, 미리 컬럼을 3 ml PBS 완충액으로 세척해 두고, 재현탁된 세포를 기계에 부착된 컬럼에 넣어 15 분 이상 머물게 한 다음 PBS로 4 회 헹구었다(rinsing). 다음에, 컬럼을 기계에서 떼내어 튜브에 두고 PBS를 적당히 넣어 플런저(plunger)로 플러쉬(flush)하여, 양성(positive) 세포들을 선택하였다.

- <21> 선택된 세포들을, 항생제(1000 U/ml 페니실린 G, 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  황산 스트렙토마이신, Gibco-BRL)와 항진균제(0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  암포테리신 B), 그리고 2 mM의 글루타민(Glutamine, Sigma)이 포함된 aMEM 배지에 20% 우태혈청(FBS; fetal bovine serum, Jeil Biotech Services)과 함께 세포성장인자로서 Stem Cell Factor(50 ng/ml), GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; 10 ng/ml), G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor; 10 ng/ml), IL-3(interleukin-3; 10 ng/ml) 및 IL-6(interleukin-6; 10 ng/ml)을 첨가하고, 세포 수  $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 의 농도로 부유시켰다.
- <22> 5 일간 배양한 세포 군집에서 부유세포를 제거하고, 부착세포가 확보된 후에는 20% 우태혈청 및 항생제가 포함된 aMEM을 배양액으로 하여 2 일 간격으로 세척과정 없이 완전 교환하여 25 일간 배양하였다.
- <23> 도 1은 본 발명의 방법에 따른 냉동 보관된 제대혈 유래 중간엽 줄기세포주 배양 과정을 보여주는 사진으로, 도 1a, 1b, 1c, 1d, 1e 및 1f는 각각 5 일, 7 일, 10 일, 14 일, 20일 및 25 일 배양한 결과이다(배율 100X). 여기에서 보듯이, 제대혈에서 분리한 단핵 세포를 배양하면, 5 일 후에는 플라스크 바닥에서 붙어 자라는 세포가 관찰되며, 7 일째가 되면 세포들이 군집을 형성하여, 여러 형태를 가진 세포로 자라난다. 배양 10 일 후에는 단핵세포에서 방추형 세포로의 분화가 이루어지고, 이 방추형 세포들이 세포 분열 및 증식을 통해 배양 25 일 후에는 완전한 중간엽 줄기세포로 배양이 완료된다.
- 24> 실시에 2: 배양된 중간엽 줄기세포의 세포 표면항원 특성
- 25> 이와 같은 과정을 통해 분리 및 배양된 방추형 중간엽 줄기세포의 세포 표면항원 특성을 알아보기 위해 세포 표면항원을 FACS로 분석하고 그 결과를 다음 표 1에 나타내었다.

FACS(fluorescence activated cell sorting; 유세포 분리기)는 관심있는 세포 표면에 발광 면역항원 표지자를 붙여 그 특성을 분석하거나, 목적에 따라 특정 항원 표지자를 가진 세포들만을 분리할 수도 있다.

<26> 【표 1】

표지자	반응
CD14	-
CD34	-
CD45	-
SH2	+
SH3	+
CD29	+
CD44	+
CD90	+
CD166	(+)

<27> 표 1에서 보면, 본 발명에 따라 분리 및 배양된 줄기세포의 경우, 조혈 줄기세포의 특징적 표지자인 CD34, CD45, CD14는 음성반응을 보였고, 중간엽 줄기세포의 특징적인 표지자인 SH2, SH3, CD29, CD44는 양성반응을 나타내었으며, CD166은 약한 양성반응이 확인되었다. 이는 본 발명에 따라 분리 및 배양된 세포가 중간엽 줄기세포임을 보여주는 것으로 해석된다.

<28> 실시예 3: 중간엽 줄기세포 배양 성공률 비교

<29> 냉동보관된 제대혈 50 유닛을 가지고 종래의 방법과 본 발명의 방법에 따라 배양하고 그 성공률을 비교하여 다음 표 2에 나타내었다.

## &lt;30&gt; 【표 2】

	종래의 방법	본 발명의 방법
중간엽 줄기세포 획득 유닛 수	0	49
배양 성공률(%)	0	98

<31> 위 표 2에서 보듯이, 중간엽 줄기세포 배양 성공률을 비교한 결과, 종래의 방법에서는 0%의 성공률을 보인 반면, 본 발명의 방법에 따르면 98%라는 높은 성공률을 보여주는 것을 알 수 있다.

## 【발명의 효과】

<32> 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따르면 세포수가 상대적으로 부족한 제대혈에서 중간엽 줄기세포를 효과적으로 분리 및 배양할 수 있으며, 이에 따르면 버려지고 있는 제대혈이 세포 치료제로서 각종 난치병을 치유하기 위한 중요한 수단으로 활용될 수 있다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

냉동 보관된 제대혈을 해동하여 aMEM(alpha-minimum essential medium) 배지로 희석하고 원심분리하여 단핵구를 수확하고;

얻어진 단핵구로부터 CD133 양성 세포를 분리하고; 그리고,

분리된 세포를 Stem Cell Factor, GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor), IL-3(interleukin-3) 및 IL-6(interleukin-6)이 포함된 aMEM 배지에 부유 배양하는 단계를 포함하는, 냉동 보관된 제대혈로부터 중간엽 줄기세포의 분리 및 배양 방법.

**【청구항 2】**

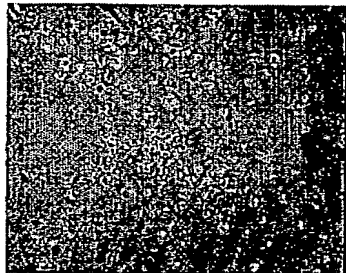
제 1 항에 있어서, 제대혈을 2 배 용량의 aMEM 배지로 희석한 후 Ficoll-Hypaque에 중첩하고 원심분리하여 단핵구를 수확하는 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 3】**

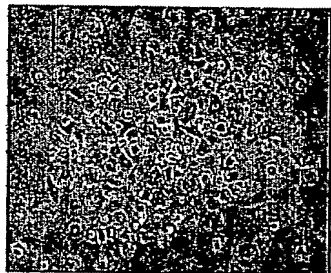
제 1 항에 있어서, 단핵구를 배양하는 aMEM 배지에 항생제, 항진균제, 글루타민 및 우태혈청이 더욱 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

【도면】

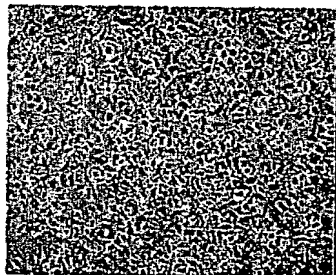
【도 1a】



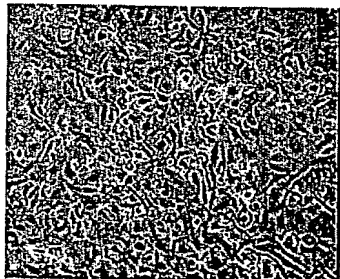
【도 1b】



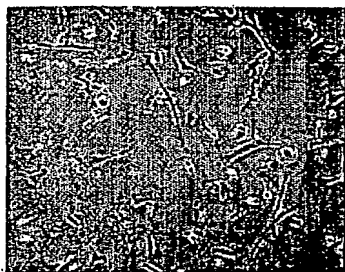
【도 1c】



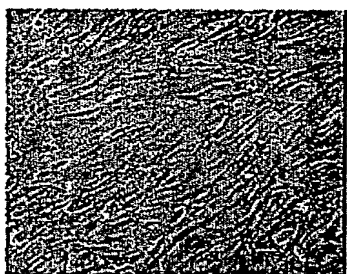
【도 1d】



【도 1e】



【도 1f】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**